

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereiches Tiermedizin
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr.Dr.h.c. J. Boch

ULTRASTRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR MORPHOLOGIE
VON TRYPANOSOMA EVANSI, STAMM BOGOR, IM BLUT DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Berthold von Blumenthal
aus
Gundelsheim am Neckar

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. H.-G. Liebich

Tag der Promotion:	25. Februar 1977
--------------------	------------------



INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. Einleitung	1
II. Die Ultrastruktur der trypomastigoten Trypanosomen (Literaturübersicht)	2
III. Eigene Untersuchungen	9
A. Material und Methoden	9
B. Ergebnisse	12
IV. Besprechung der Ergebnisse	23
V. Zusammenfassung	28
Summary	28
VI. Literaturverzeichnis	30
Lebenslauf	34

II. DIE ULTRASTRUKTUR VON TRYPOMASTIGOTEN TRYPANOSOMEN (Literaturübersicht).

Die zur Familie Trypanosomatidae zählende Gattung Trypanosoma gliedert sich in die diskontinuierlich sich vermehrenden Stercoraria und die kontinuierlich sich vermehrenden Salivaria auf. Die Salivaria werden in die drei Gruppen (a) vivax, (b) congolense und (c) brucei unterteilt. Unter der letzteren ist neben den Untergruppen suis und brucei die evansi-Untergruppe mit den Arten T. evansi, T. equinum und T. equiperdum vertreten, welche bei verschiedenen Säugetieren wie Equiden und Boviden in der trypomastigoten Form im Blut parasitieren. Diese Formen weisen in wesentlichen Merkmalen einen gemeinsamen Grundbauplan (MÜHLPFORDT und BAYER, 1961) auf, wobei der Kinetoplast durch seine terminale oder subterminale Lage besonders auffällt.

Die äußerste Schicht der Pellicula dieser Parasiten bildet die glykoproteidhaltige Glykokalix, die außer der gesamten Zelloberfläche die Geißeltasche auskleidet und die Geißel überzieht (VICKERMAN, 1968 und 1969 b). Sie besteht aus mäßig elektronendichtem Material von ca. 15 nm Dicke bei T. congolense. Bei T. lewisi unterscheidet sich diese Schicht topographisch gegenüber der von anderen Arten; sie gestaltet sich häufig filamentös und rauh. WIGHT und LUMSDEN (1969) stellten bei der Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure an T. brucei fest, daß sich deren Oberflächenschicht im Bereich der vorderen Region des Zellkerns mit elektronendichten Flecken von 60 - 220 μm Durchmesser anfärbt. Als eine Sonderbildung der Glykokalix bezeichnet VICKERMAN (1969 b) die undulierende Membran zwischen Zellkörper und Geißel. Im Geißelhalsbereich vermitteln zwischen den beiden Glykokalixschichten die Desmosomen die Anheftung von Zelleib und Geißel. Sie liegen einreihig in gleichen Abständen zueinander. SMITH u. Mitarb. (1974) fanden bei T. brucei in dieser mit der Macula adhaerens von Epithelzellen vergleichbaren Zone mit Hilfe der Gefrierätzung 60 desmosomale Verbindungsstellen in Abständen von 750 - 900 $\text{\AA}$ zueinander. Für die relativ elektronendichte Zwischenschicht gaben ANDERSON und ELLIS (1965) an ultradünn-geschnittenen Präparaten von T. lewisi eine Dicke von 50 $\text{\AA}$ an. Die Desmosomen stellen sich als eine Anhäufung von je 3 - 6 bis zu 80 $\text{\AA}$

große Partikel heraus.

Die unter der Glykokalix gelegene ca. 8 nm starke Zellmembran weist 3 Schichten auf, von denen die beiden äußeren beim Ultradünnschnitt kompakter erscheinen (HOARE, 1972). SEED u. Mitarb. (1973) zeigten an gefrierespalteten Objekten von *T. cruzi* den Unterschied zwischen der glatten Oberfläche der äußeren Schicht und der rauhen Topographie der inneren Schicht auf. Nach ihrer Ansicht lassen sich die einzelnen Lagen maßstabgetreu mit Hilfe des Gefrierbruchs darstellen. Die gleichen Ergebnisse erzielten SEED u. Mitarb. (1972) bei entsprechenden Untersuchungen an *T. congolense*.

Unterlagert wird die Zellmembran von einem in Längsrichtung zur Zelle verlaufenden System von ungefähr 100 Microtubuli, (HOARE, 1972), die wegen ihrer Parallelität besonders auffallen. In einer Tiefe von 80 - 100 Å gelegen, nehmen sie zueinander Abstände von 200 - 300 Å ein. Für ihre beiden in Längsschnitten nachweisbaren dunklen Randstreifen ermittelten SCHULZ und MAC CLURE (1961), ANDERSON und ELLIS (1965) und RUDZINSKA und VICKERMAN (1968) je eine Breite von 50 - 60 Å und somit für die Microtubuli einen Durchmesser von 150-250 Å. Im Bereich der Geißeltasche erweitern sich die Normalabstände der Microtubuli nach Angaben von ANDERSON und ELLIS (1965) auf 800 Å. Übereinstimmend mit ANGELOPOULOS (1970) berichten sie von terminalen Zentriolen, die als gemeinsamer Ursprungsort der Microtubuli dienen. Anhaltspunkte für direkte Verbindungen oder Anastomosen liegen nicht vor. Hingegen enden einige Tubuli vor dem Eintreffen in die Zellpole frei unter der Pellicula. SEED u. Mitarb. (1972 u. 1973) fanden diese Besonderheit an beschatteten Zellmembranabdrücken bei *T. cruzi* und bei *T. congolense* bestätigt.

Als auffälligstes Organell der Zelle erscheint der Zellkern, der gewöhnlich in der Zellmitte oder in der vorderen Zellhälfte liegt (HOARE, 1972). Die den Kern umgebende rauhe und unregelmäßig gestaltete Doppel-Membran ist von mehreren bis 30 nm großen Poren durchsetzt. Sie enthalten ein Diaphragma. Die Anzahl der Poren beläuft sich nach den Angaben von SEED u. Mitarb. (1973) auf ungefähr 60 - 80. Das Kerninnere weist elektronenoptisch mit Ausnahme des Nucleolus nach RUDZINSKA und VICKERMANN (1968) keine klare

Strukturierung auf. Dagegen lassen sich die chromosomalen Aggregationen, die die periphere Kernlage bevorzugen, mit Bleisalzen und Uranylacetat kontrastieren. Noch deutlicher läßt sich ihr Verteilungsmuster mit den herkömmlichen Färbemethoden, wie der Feulgen-Reaktion, durch Kontrastieren mit Pyronin oder mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie näher bestimmen (BAKER, 1961). Die Chromosomenzahlen betragen für die Arten der Evansi-Untergruppe 6, für *T. cruzi* 6-10 und für *T. brucei* 6-8 (JADIN, 1971). Der Kern kann einen Nucleolus besitzen. Dieser markiert sich deutlich mit seiner relativ homogenen, ribosomenartigen und elektronendichten Masse (RUDZINSKA und VICKERMAN, 1968; HOARE, 1972).

Der Geißelapparat setzt sich aus der für die Fortbewegung zuständigen Geißel und ihrem Ursprungsteil, dem Blepharoplasten zusammen. Nach RUDZINSKA und VICKERMAN (1968) und JADIN (1971) bildet er ein zylinderförmiges Gebilde von ca. 600 - 700 nm Länge und 200-250 nm Durchmesser und liegt zum Teil intrazellulär. Der distale, membranumgrenzte Teil ragt hierbei in die Geißeltasche. Anfangs von neun peripher gelagerten, längsverlaufenden Doppeltubuli gebildet, die wie bei *T. vivax* (MÜHLPFORDT, 1975) durch Fibrillen verbunden sind, ist der im Zytoplasma liegende Teil aus neun Dreiergruppen wagenradförmig angeordneter Mikrotubuli gebildet. Dieses Organell, auch Basalkorn genannt, bildet zum Zytoplasma hin einen offenen Abschluß. Den Übergang zur Geißel stellt eine doppelteilige Querplatte her (RUDZINSKA und VICKERMAN, 1968; HOARE, 1972). Auffallend ist die deutliche Lagebeziehung zum Kinetoplasten, wobei zwischen beiden Organellen bisher keine zusammenhängenden Strukturen festgestellt werden konnten.

Die Geißel inseriert an der bereits genannten Querplatte des Blepharoplasten und ist von der Pellikula entsprechend dem Aufbau-schemata der vorherig beschriebenen Zelloberfläche eingehüllt. Diese Geißelscheide beherbergt den Achsenzylinder, der wiederum die neun typischen peripheren, gut kontrastierbaren Doppeltubuli und das zentrale Tubuluspaar erkennen läßt. Für den peripheren Tubulusdurchmesser bei *T. equiperdum* geben ANDERSON, SAXE und BEAMS, (1956) ca. 370 Å an.

ANDERSON und ELLIS (1965) stellten fest, daß an den peripheren Tubuli in ganz bestimmter Anordnung kleine Seitenarme von ca. 50 Å im Durchmesser zum Teil in Richtung Zentraltubuli austreten. Die meisten Seitenarme orientieren sich zum filamentösen, akzessorischen Komplex, der zweiten bedeutenden Grundstruktur der Geißel. Dieses System, auch Intraflagellarstruktur genannt, korrespondiert mit der undulierenden Membran. Am freien Geißelende scheint sich diese Struktur zu verlieren (HOARE, 1972). FUGE (1969) beschreibt diesen Komplex als ein aus verschiedenen Lagen mit jeweils parallel verlaufenden Filamenten, wodurch sich ein charakteristisches Wabenmuster ergibt. Dieses System läßt sich ebenfalls sehr gut an Geißeln mit weggebrochenen Membranen darstellen (SEED u. Mitarb., 1972 und 1973).

Das doppelmembranige Mitochondrium windet sich als ein einheitlicher Schlauch von unterschiedlicher Stärke in Längsrichtung der Zelle durch das Zytoplasma. Die Mitochondrien der zu den zyklischen Trypanosomen zählenden Blutformen erscheinen sehr ausgeprägt und können wie bei *T. vivax* (MÜHLPFORDT, 1975) Verzweigungen in Form von Schlingen aufweisen. Derartige Bildungen können am häufigsten im vorderen Zellbereich, in der Höhe des Zellkerns und in der Kinetoplastregion angetroffen werden (MÜHLPFORDT, 1975). Die Mitochondrien der den nichtzyklischen Trypanosomen zugeordneten Blutformen nehmen dagegen ein geringeres Volumen ein oder sie können völlig verschwinden (VICKERMAN, 1963). Die aus der Mitochondrienwand herausragenden cristae treten in zwei verschiedenen Typen auf. VICKERMAN (1969 a) fand bei *T. congolense* cristae sowohl vom tubulösen als auch vom villösen Typ vor.

Der als DNS-haltige, terminal oder subterminal gelegene und dem Blepharoplasten zugeordnete Bestandteil des Mitochondriums wird Kinetoplast genannt und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Er spielt eine bedeutende Rolle als Artunterscheidungsmerkmal und mißt ungefähr 1 µm im Längsdurchmesser (HOARE, 1972; RUDZINSKA und VICKERMAN, 1968; MÜHLPFORDT, 1964; JADIN, 1971).

Sein Grundbauplan gestaltet sich nach einem einheitlichen Schema; mehrere verschiedene Strukturen sind am Aufbau dieses Organells beteiligt (MÜHLPFORDT, 1963 a): die sie umgebende 120 - 200 Å star-

ke Doppelmembran einschließlich der von ihr ausgehenden schlauchförmigen Bildungen, eine der Membran anliegende Zone feingranulärer Massen, auch Matrix genannt und im Zentrum massendichtere, lamellär angeordnete, Feulgen-positive, DNS-haltige Strukturen. Trotz gleichen Grundaufbaus ergeben sich beträchtliche Unterschiede. Die Blutformen von *T. cruzi*, *T. lewisi* und *T. duttoni* besitzen einen voluminösen Kinetoplasten, dessen Zentralstruktur kräftig entwickelt ist. Dagegen ist dieses Organell bei *T. congolense* (VICKERMAN, 1969 a) und bei den Trypanosomen der Brucei- und Evansi-Gruppe schwächer ausgebildet. Einen Übergang der Kinetoplastenmembran in die Wandstrukturen der Mitochondrien konnte MÜHLPFORDT (1963 b) nur bei den Blutformen von *T. lewisi*, *T. duttoni* und *T. cruzi* nachweisen. Bei *T. vivax* fällt zusätzlich im Kinetoplasten ein lateral fibröser Knoten auf, den MÜHLPFORDT (1975) im Gegensatz zu RUDZINSKA und VICKERMAN (1968) für keine konstante Bildung hält.

Schon recht frühzeitig befaßten sich einige Untersucher wie HOARE und BENNETT (1937) und später HOARE (1954) mit natürlich "akinetoplastischen", feulgen-negativen Stämmen von *T. evansi*, die für diese Erscheinung besonders prädestiniert sind. HOARE (1954) berichtete über langjährige Beobachtungen an den "akinetoplastischen" Evansi-Stämmen SAK, NS und MA. Die gleiche Eigenschaft bestätigten FROMENTIN u. Mitarb. (1974) am Stamm annamense von *T. evansi*. Mittlerweile wurde allgemein die Bezeichnung akinetoplastisch durch dyskinetoplastisch ersetzt (COSGROVE, 1973). MÜHLPFORDT (1964) spricht von atypischen Kinetoplasten.

Neben der natürlichen Dyskinetoplastie bei den trypomastigoten Formen der Brucei-Gruppe liegen zahlreiche Untersuchungen vor, bei denen kinetoplastaffine Substanzen diese Eigenschaft künstlich herbeiführten (KILLICK-KENDRICK, 1964).

Das Endoplasmatische Reticulum stellt ein System membranöser Tubuli mit teilweise endständigen Vesikeln dar. Mit der äußeren Kernmembran in Verbindung stehend (HOARE, 1972; JADIN, 1971), tritt dieser Komplex in zwei verschiedenen Typen auf. Der rauhe oder granuläre Typ, der reich und gleichmäßig mit Ribosomen besetzt ist, bevorzugt die Region zwischen Zellkern und Kinetoplast. Im Bereich

der Anheftungszone zwischen Zelle und Geißel wird eine Gruppe von 3 - 4 subpelliculären Microtubuli häufig von einer ribosomenhaltigen Divertikelbildung unterlagert. Das endoplasmatische Retikulum vom glatten Typ beschränkt sich nach VICKERMAN (1969) auf die Region zwischen Nucleus und Geißeltasche. Freie Ribosomen sind bei jeder Art über das gesamte Zytoplasma verteilt.

Der Golgiapparat, ein Komplex tubulärer Elemente und Zisternen liegt in der hinteren Zellregion in Nähe des Kinetoplasten. Die Zisternen können sich zu Aussackungen erweitern und lysosomenartige Vesikel an das Zytoplasma abgeben (HOARE, 1972). Einige von ihnen ähneln den Volutinggranula.

Eine Einteilung der verschiedenen Einschlußkörper nach morphologischen Gesichtspunkten erscheint nach VICKERMAN und EYDEN (1973) bei der zweidimensionalen Abbildung und wegen des Artefaktproblems bedenklich. In ähnlichem Sinne befürwortet MÜHLPFORDT (1975) eine Bestimmung und Identifizierung auf histochemischem Wege. Eine Einteilung nach morphologischen Größenordnungen bieten WATSON und LEE (1975) bei *T. duttoni* an.

Sehr eingehend befaßt sich JADIN (1971) mit den Lysosomen. Er unterscheidet primäre Lysosomen mit homogenem Inhalt von sekundären Lysosomen mit heterogener Masse. Letztere entstehen im Rahmen der intrazellulären Verdauung aus der Verschmelzung von einem primären Lysosom mit ein oder mehreren Phagosomen (Nahrungsvakuolen).

Unter Volutinggranula versteht ORMEROD (1961) im Phasenmikroskop sichtbare, lichtbrechende Einschlußkörperchen, die bei einer Reihe von Trypanosomen nachgewiesen wurden. Sie sind sehr leicht mit den "Chemotherapy granules" zu verwechseln, die nach Einwirkung einer bestimmten chemischen Substanz entstehen.

"Membrane bound dense bodies" werden von RUDZINSKA und VICKERMAN (1968) als Einschlußkörper bezeichnet, die von einer heterogenen Masse erfüllt und von einer Elementarmembran umgeben sind. Sie treten im Zytoplasma der Blutformen der Gruppen von *T. congolense*, *T. vivax* und *T. brucei* auf.

TAYLOR und GODFREY (1969) beschreiben ein "subpelliculäres Organell" bei *T. brucei*, *T. congolense* und *T. vivax*. Eine Gruppe von 4 sub-

pelliculären Microtubuli im Bereich der Anheftungszone wird von einer vesikulären Membran unterlagert. Diese nimmt zumindest bei *T. brucei* Verbindung mit der äußeren Kernmembran auf.

PRESTON (1969) beschreibt u.a. bei der trypomastigoten Form von *T. raiae* die Anwesenheit eines tubulusförmigen Cytostoms an der Geißeltasche. Untersuchungen mit kationisiertem Ferritin als elektronendichter Tracer zeigten, daß diese Substanz über das Cytostom eingeschleust wird.

MACADAM und HERBERT (1970) wiesen die Existenz von Filopodien anhand von ultradünngeschnittenem Material bei *T. rhodesiense* und bei *T. brucei* (Typ ETat 2) nach. Hierbei handelt es sich um Zytoplasmaausläufer, die keine besondere Innenstruktur enthalten. Sie bestätigten die Ergebnisse, die WIGHT und LUMSDEN (1969) ebenfalls bei *T. brucei* erzielt hatten.

Die Zellteilung erfolgt bei den trypomastigoten Trypanosomen in Form einer binären Aufspaltung (HOARE, 1972). Sie beginnt mit der Ausbildung eines Tochterblepharoblasten, der bereits die Tripletstrukturen enthält. Unter Größenzunahme schiebt er sich in Richtung Geißeltasche vor und bildet über sie eine neue Geißel. Mit der Entstehung einer zweiten Geißeltasche trennen sich auch die beiden Geißeln voneinander.

Das erste Anzeichen einer Teilung ist am Kinetoplasten zu beobachten, dessen massendichte balkenförmige Struktur eine Erweiterung und anschließend eine Durchschnürung erfährt. Nach der Abtrennung des neuen Kinetoplasten vollzieht sich die Spaltung des Mitochondriums.

Im Zellkern erfährt der Nucleolus eine Durchtrennung und eine Lageveränderung seiner abgetrennten Hälfte. Entsprechend halbiert sich der Chromosomensatz, was mit der Aufteilung in zwei Tochterkerne einhergeht. Die Zellteilung endet schließlich mit der Durchtrennung des Zytoplasmas.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methoden

Für die Untersuchungen stand der trypomastigote Stamm B O G O R von Trypanosoma evansi, 1956 in Bogor (Indonesien) isoliert, zur Verfügung. Zu seiner Anreicherung und Gewinnung sind fortlaufende Passagen notwendig. Als Versuchstiere dienten Mäuse vom Stamm NMRI-Han. aus institutseigener Zucht. Bei schnell aufeinanderfolgenden Passagen ist die Vermehrungsrate von T. evansi so hoch, daß nach 3 - 4 Tagen die Mäuse der Infektion erliegen. Der mortale Parasitämiegrad liegt dann bei ca. 60 - 70 Parasiten / mm³ Blut.

Für die intraperitoneale Infektion der Mäuse versetzte ich 1 Tropfen mit Vetren^R heparinisiertes Blut von hochparasitämischen Mäusen (3 Tage p.i.) mit 0,5 cm³ physiologischer Kochsalzlösung. Die Blutentnahme für die Untersuchungen erfolgte am dritten Tage nach der Infektion aus dem retroorbitalen Plexus mit heparinisierten Pasteurpipetten.

Für die elektronenmikroskopische Präparation wurde zur Vorfixierung in einem Zentrifugenglas 1 cm³ stark parasitenhaltiges Blut mit einer auf 4°C herabgekühlten Fixierlösung aus 3%igem Glutaraldehyd in 0,05 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) versetzt und sofort 10 Minuten lang bei 2000 UpM zentrifugiert. Den hierbei auf dem Blutkuchen entstandenen besonders stark trypanosomenhaltigen Saum hebte ich mittels einer Pasteurpipette ab, resuspendierte ihn in einem frischem Fixativ gleicher Zusammensetzung und zentrifugierte diese Suspension erneut 10 Minuten lang bei 2000 UpM. Nach ca. 12-stündiger Fixation bei 4°C wurde das Pellet dreimal je 2 Stunden bei 4°C mit 0,05 Cacodylatpuffer (pH 7,2) gewaschen, jeweils resuspendiert und 10 Minuten bei 2000 UpM zentrifugiert. Zur weiteren Fixierung kam das Zentrifugat 1 Stunde lang in eine Lösung von 1% Osmiumtetroxid in Daltonpuffer (pH 7,2) (DALTON 1955). Nach viermaligem Auswaschen in diesem Puffer in Abständen von je 10 Minuten erfolgte die stufenweise Alkoholdehydrierung bei zunächst 4°C bis zum absoluten Alkohol nach folgendem Schema: (a) 15 Minuten 50%iges Äthanol, (b) 30 Minuten 70%iges Äthanol und Zusatz von 1% Uranylacetat

zur Zwischenkontrastierung, (c) 30 Minuten 90%iges Äthanol und als letzte Stufe (d) zweimal 30 Minuten absoluter Alkohol bei 22°C. Jedem Austausch schloß sich eine 5 Minuten lange Zentrifugation bei 2000 UpM an.

Als Intermedium dienten zunächst zweimal 15 Minuten lang Propylenoxid und anschließend Mischungen aus Propylenoxid und Durcupan^R ACM (Fa. Fluka, Heidelberg) im Verhältnis 1 : 2 für 30 Minuten und 1 : 4 für 12 Stunden bei 22°C. Nach dieser Inkubationszeit konnte das pelletierte Material zweimal 1 Stunde zur Vorpolymerisation mit dem Einbettungsmittel Durcupan^R ACM versetzt und im Brutschrank bei 50°C bebrütet werden. Anschließend bettete ich die Pellets zusammen mit frischem Durcupan^R ACM in Gelatinekapseln ein und ließ sie 48 Stunden bei 60°C im Brutschrank aushärten. Nach Entfernen der Gelatinekapseln in kaltem Wasser trimmte ich mit einer Rasierklinge die Blöckchen, die dann der Herstellung von ca. 500 Å dicken Ultradünnschnitten an einem Porter Blum MT 1 Mikrotom (Sorvall) dienten.

Anschließend zog ich die Schnitte auf Formvar-befilmte Kupfernetze auf und kontrastierte sie mit Uranylacetat und mit Bleicitrat nach REYNOLDS (1963)..

Für die Präparation mit Hilfe der Gefrierätztechnik kamen zur Vorbereitung 2 cm³ stark parasitenhaltiges Blut 2 Stunden lang in ein Fixativ aus 1%igem Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) bei 4°C. Nach 15 Minuten Zentrifugieren bei 3000 UpM zentrifugierte ich den Überstand ein zweites Mal zu den gleichen Bedingungen, versetzte den weißen Saum über den festen Blutbestandteilen mit frischem Fixativ von 4°C und resuspendierte es zusammen mit dem Sediment des Überstandes, welches noch besonders reichhaltig an Trypanosomen war. Eine 10 Minuten lange Zentrifugation bei 3000 UpM schloß sich an. Nach 2 Stunden ersetzte ich das Fixativ durch eine Lösung aus 30%igem Glycerin in 0,1 M Cacodylatpuffer und zentrifugierte nach einstündiger Inkubationszeit bei 22°C ein drittes Mal 10 Minuten bei 500 UpM.

Mit einer Skalpelloklinge zerkleinerte ich die hieraus gewonnenen Pellets und setzte diese mittels einer feinen Lanzette auf Goldobjektträger, in die ich zuvor zur besseren Haftung der Proben etwas

Puffer eingefüllt hatte. Zum Tiefgefrieren kühlte ich diese Proben 10 Sekunden lang durch Eintauchen in Freon 22 auf -160°C herab und erreichte anschließend nach rascher Überführung in flüssigen Stickstoff eine Endtemperatur von -196°C .

Den Gefrierätzvorgang führte ich in der Gefrierätzanlage BAF 300 der Fa. Balzers (Liechtenstein) durch. Die rasch auf den auf -150°C herabgekühlten Objektisch überführten Proben wurden im Hochvakuum bei mindestens 10^{-6} Torr mit dem rotierenden auf -196°C vorgekühlten Mikrotommesser "angeschnitten" und die Bruchfläche bei einer Objektischtemperatur von -100°C für die Dauer von 90 Sekunden absublimiert. Aus den "geätzten" Oberflächen entstanden nach einer 5 Sekunden langen Beschattung mit Platin-Kohle unter einem Winkel von 45° und nach einer 8 Sekunden langen senkrechten Bedampfung mit reiner Kohle Präparatabdrücke mit Negativrelief.

Nach Belüften des Rezipienten und Entnahme der Proben vom Objektisch erfolgte die Ablösung des Abdruckes von den Proben in Aqua bidest., anschließend die Vorreinigung in 70%iger Schwefelsäure für die Dauer von 12 Stunden und die Spülung mit Aqua bidest. für 15 Minuten. Nach einer weiteren einstündigen Reinigung mit Eau de Javelle wusch ich die Abdrücke dreimal je 15 Minuten nach.

Die nun gereinigten Präparatabdrücke streckte ich mit Aceton, wusch sie abermals in Aqua bidest. und zog sie auf Formvar-befilmte Kupfernetze auf.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Siemens Elmiskop 101 bei einer Heizspannung von 80 kV. Als Filmmaterial diente Agfa Scientia 23 D 56 (Film und Platten). Die Entwicklung erfolgte in Refinal (Agfa) bei 20°C 9 Minuten lang, anschließend wurde 10 Minuten lang fixiert.

In den gedruckten Exemplaren (DIN A 5)
sind alle Vergrößerungsangaben um 30 %
zu verringern.

B. Ergebnisse

Der Stamm B O G O R von *Trypanosoma evansi*, dessen Körperlänge einschließlich Geißel ca. 15 µm beträgt, weist in Übereinstimmung mit anderen Arten der *T. evansi* - Untergruppe und darüberhinaus den trypomastigoten Formen der Sektionen *S t e r c o r a r i a* und *S a l i v a r i a* einen einheitlichen Grundbauplan auf.

Das Verteilungsmuster der verschiedenen Zellorganellen ändert sich entsprechend der jeweiligen Schnittebene bzw. Bruchfläche. Bestimmte Lagebeziehungen sind innerhalb einzelner Strukturen vorhanden und ergeben auf diese Weise ein charakteristisches Zellbild. Sowohl die nach Ultradünnschnitt wie auch nach Gefrierätzung elektronenmikroskopisch untersuchten Trypanosomen zeigen in der Übersicht die für diese Protozoen typische gedrungene und lanzettförmige Gestalt. Die Parasiten liegen im Blutplasma, wobei aber mehrfach direkter Kontakt mit den Erythrozytenmembranen zu erkennen ist (Abb. 1a).

Die äußere Begrenzung des Parasiten wird von der 12 nm dicken Zellmembran gebildet, der außen die Glycocalix aufgelagert ist. Diese Pellikula besteht aus der äußeren Elementarmembran und einer einfachen inneren Membran. Sie überzieht den Zellkörper in einheitlicher Stärke, kleidet die Geißeltasche aus und bildet die Umhüllung des distalen Teils des Blepharoblasten und der aus ihm hervorgehenden Geißel. Die äußere, mäßig osmiophile Schicht ist 4,5 nm dick und läßt auf ihrer Außenfläche zahlreiche, kleinste Partikel in unterschiedlicher Verteilung erkennen, was auf Spaltflächen der Trypanosomen nach Gefrierätzung nachweisbar ist (Abb. 2b). Daneben treten weniger häufig in ähnlicher Verteilung kuppenförmige Erhebungen bis 2,5 nm auf. Diese sind mit kleinsten, kraterförmigen, oberflächlichen Vertiefungen vergesellschaftet. Mit Ausnahme der Geißelmembran finden sich seltener 15 nm breite und 40 nm tiefe, zu meist senkrecht gerichtete oder gewundene, trichterförmige Einstülpungen. Die Übergangsstelle von Zell- und Geißeltaschenmembran ist mit einer aus Partikeln bestehenden, parallel zum Querschnitt des Geißeltaschenhalses verlaufenden punktierten Linie versehen.



Abb. 1: *Trypanosoma evansi*, Stamm BOGOR

a) Übersicht, $\times 20\ 000$

b) Mitochondrium u. subpellikuläre Mikrotubuli $\times 40\ 000$

E = Wirtserthrozyt; Fl = Flagellum; gER = glattes endoplasmatisches Reticulum; ImK = intramitochondriales Körperchen; mi = Mitochondrium; mt = subpellikuläre Mikrotubuli; N = Kern; Nu = Nucleolus; Pe = Pellikula; rER = rauhes endoplasmatisches Retikulum; V = Vesikel.



Abb. 2: *Trypanosoma evansi*, Stamm BOGOR nach Gefrierätzung

a) Übersicht, x 75 000

b) Aufsicht auf die innere Membran der Pellikula, x 70 000

Bl = Blepharoplast; Gt = Geißeltasche; mi = Mitochondrium; mt = sub-pelliculäre Mikrotubuli; OM = äußere Membran; V = Vakuole.

Das innere Blatt der Elementarmembran stellt mit 3,0 nm Dicke den dünnsten Anteil dar. Auffallend ist ihre gleichmäßige Elektronendichte, sie besitzt keine Auflagerungen. Nach innen schließt sich das 4,5 nm dicke Blatt, das die gleiche Kontrastqualität wie die erste Schicht aufweist, an. Seine dem Zytoplasma anliegende Fläche läßt entsprechend den Verhältnissen an der äußeren Fläche der äußeren Membran nahezu gleich große und geformte Partikel in geringerer Anzahl erkennen.

Ca. 90 Å unter der inneren Membran liegt ein System von rund 120 subpellikulären Mikrotubuli (Abb. 1b). Nach Gefrierätzung deuten sich diese auf der absublimierten Oberfläche als eine zur Längsachse der Zelle schräg gerichtete parallele Streifung oder als kleine Erhebungen in etwa gleichen Abständen an (Abb. 2b). An Längsschnitten fällt auf, daß einige Tubuli vor dem Eintreffen an den Zellenden frei auslaufen und die übrigen an einem dort gelegenen Pol konvergieren, ohne sich direkt zusammenzulagern (Abb. 1b). Die subpellikulären Mikrotubuli unterlagern jedoch weder die Membranen der Geißeln, noch die der Geißeltasche. Die Zwischenabstände der einzelnen, runden Mikrotubuli betragen durchschnittlich 16 nm und ihre Durchmesser 25 nm. Ihre kontrastreichen Membranen haben eine Wandstärke von 50 Å. Das System der Mikrotubuli paßt sich stets dem Verlauf der Zellmembran an.

Der Zellkern von *T. evansi* ist von ovaler bis langgestreckter Form und bildet die auffälligste Innenstruktur (Abb. 1a). Von der zentralen Lage aus kann er eine teilweise Verlagerung und Streckung in den vorderen Zellbereich vollziehen. Seine Größe schwankt in seiner Längsausdehnung zwischen 1,2 und 2,5 µm; seine Breite nimmt Ausmaße von 0,6 bis 1,1 µm an. Abweichungen von der Grundform des Kerns können bei entsprechender Formänderung der Zelle eintreten. Umgeben wird der Zellkern von einer durchschnittlich 18 nm dicken, sich deutlich markierenden osmiophilen doppelwandigen Membran. In ihrer Umgebung kommt es zur Ansammlung von Chromatin auf der Kerninnenseite und Ribosomen auf dessen Außenseite.

Das äußere Blatt des Nucleolemma entläßt einige tubulöse Ausläufer zum rauhen endoplasmatischen Retikulum. Der ungleichmäßig weite perinukleäre Raum ist stellenweise im Ultradünnschnitt an den Kernporen unterbrochen. Nach Gefrierätzung fallen diese deutlich als

40 - 90 nm große, unregelmäßig verteilte und rundliche Vertiefungen auf.

Als bedeutendster Kernbestandteil hebt sich der 0,5 - 0,8 μm lange und 0,35 bis 0,5 μm breite Nukleolus nach Kerndurchbrüchen als feingranulierte, kompakte Masse, die im Ultradünnschnitt als osmio-phil, dem Nukleolus assoziiertes Chromatin identifiziert werden kann, hervor (Abb. 1a). Er kann innerhalb des Kerns jede Lage einnehmen. Im locker strukturierten, kontrastarmen und grobgranulierten Kernplasma gruppieren sich vornehmlich im Randbereich gleichmäßig, jedoch nur an Ultradünnschnitten sichtbare elektronendichte Chromatinstrukturen als schlierenförmige Gebilde. Ihre diffuse Verteilung nimmt zur Kernmitte hin ab.

Der Geißelapparat, der für die Fortbewegung und Nährstoffaufnahme zuständige Teil der Zelle (Abb. 3a), besteht aus dem von anderen Trypanosomen her bekannten Blepharoplasten als Basisteil, der Geißel und Geißeltasche. Das erstgenannte Organell bildet einen von feingranulärem Zytoplasma umgebenen Zylinder von ca. 0,5 μm Länge und 0,24 μm Durchmesser. Er hat zum Zytoplasma hin keinen Abschluß, es besteht ein offener Übergang. Sein Fibrillarkörper wird im distalen Teil ebenso wie der der Geißel von den hierfür typischen unter der Pellikula gelegenen, peripher und wagenradförmig angeordneten Doppeltubuli gebildet. In seinem proximalen Teil dagegen treten an die Stelle der Doppeltubuli solche in Dreiergruppen (Abb. 4a). Innerhalb dieses Fibrillarkörpers besteht, abgegrenzt durch ein einfaches Querseptum nahezu auf Höhe der Umschlagstelle der Geißeltaschenmembran, der proximale Teil aus einer massendichteren Zone; der distale, durch den Abschluß der zweiteiligen Basisplatte (Abb. 3a) gebildete Teil hingegen zeigt eine elektronenlichte, strukturarme Zone. Gelegentlich treten in ihr kleine, rundliche Granula von 0,13 μm Größe auf. In fast rechtwinkliger Lage zum Blepharoplasten und der Nachbarschaft der Geißeltaschenmembran ist eine rechteckförmige, streifige Anbildung zu beobachten. Sie stellt den Tochterblepharoplasten dar, der Ausdruck einer beginnenden Zellteilung ist (Abb. 3a).

Die Geißel entspringt an der zweiteiligen Basisplatte. Diese nimmt die Breite des Fibrillarkörpers ein und fügt sich aus einem proxi-

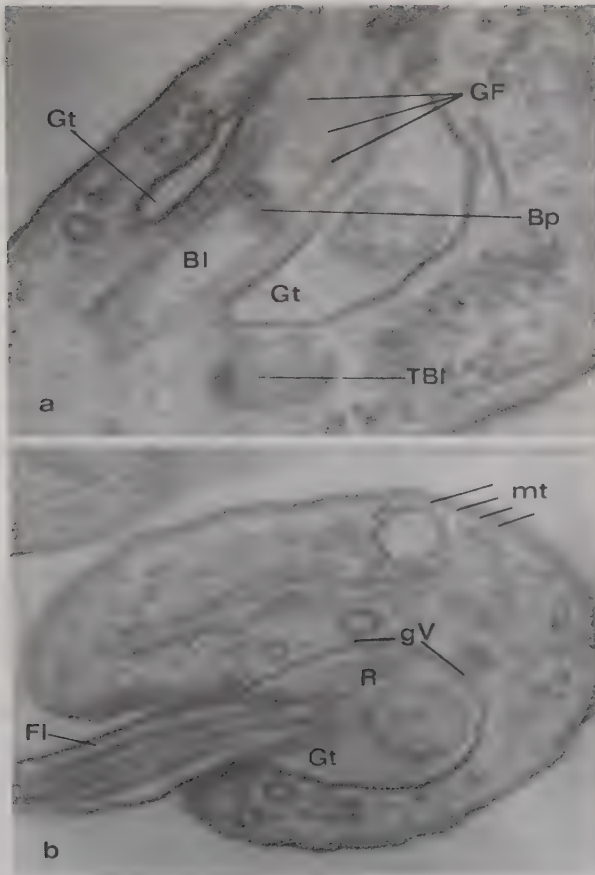


Abb. 3: Proximaler Teil des Geißelapparates von *T. evansi*
 a) Blepharoblast u. Tochterblepharoblast, x 110 000
 b) Ursprungsteil der Geißel, x 60 000

Bl = Blepharoblast; Bp = Basalplatte; Fl - Flagellum; GF = Geißelfibrillen; Gt = Geißeltasche; gV = gestielte Vesikel; mt = Mikrotubuli; TBl = Tochterblepharoblast; R = Zellreste.

malen, zentral gelegenen, schmalen und einem distal gelegenen, breiten Anteil zusammen. Ihre Größe beträgt in Achsenrichtung 80 nm. Die Basisplatte dient als Ausgangsort des zentralen, voneinander um ca. 9 nm getrennt verlaufenden und durch ein feines Ligamentum verbundenen Tubuluspaares (Abb. 4b). Der Fibrillarkörper der Geißel läßt im Querschnitt die typische wagenradförmige 9 : 2 Anordnung der Fibrillen erkennen. Unter den peripheren Fibrillen entläßt die weitlumigere Subfibrille A zur von ihr getrennt liegenden, englumigen Subfibrille B zwei etwa gleichlange, armartige Fortsätze, die jedoch keinen Kontakt mit dieser aufnehmen. Zwischen den zentralen und den peripheren Fibrillen, deren Tubulusdurchmesser kaum von dem eines subpellikulären Mikrotubulus abweicht, scheint ein kranzförmiger Saum aus Filamenten zu bestehen (Abb. 4b).

Eine weitere Geißelstruktur, die den Fibrillarkörper seitlich vermutlich bis zum vorderen Zellende begleitet und den ungleichförmigen Geißelquerschnitt bewirkt, stellt die in Schrägschnitten gestreifte Intraflagellarstruktur dar (Abb. 4a). Sie baut sich aus wenigen Lagen mit jeweils verschieden gerichteter Streifung auf und lagert sich zu einem regelmäßigen Netzwerk zusammen. Für die einzelnen Abstände konnte ich 25 nm ermitteln (Abb. 5b).

Die Geißeltasche, die aus Geißeltaschenhals und Geißeltaschenbasis besteht, bildet eine von der Zellmembran ausgekleidete birnenförmige, häufig asymmetrische Aussackung (Abb. 4a). Sie mißt in Längsrichtung 0,9 μm und enthält gelegentlich bis zu drei oval geformte, wenig kontrastierbare Zellreste, welche bis 0,13 μm Größe annehmen können (Abb. 3b). Der Zwischenspalt zwischen Geißel und Geißeltaschenhals wird durch eine mäßig osmiophile, nicht näher bestimmbar fibröse Kontaktzone gebildet. Diese setzt sich beiderseits von Geißel und Zellmembran als graue und strukturarme und leicht streifige Verdichtungszone fort. An der Geißeltaschenbasis ist im Abstand von rund 60 nm das selten auffindbare subpellikuläre Organell, ein System aus 4 aneinandergereihten, je 16 nm dicken Tubuli zu beobachten (Abb. 4a).

Die zwischen Geißel und Zelleib gebildete Kontaktzone zeigt die Anwesenheit desmosomaler Verbindungsstellen in einer Sequenz von ca. 500 Å. Mit Hilfe der Gefrierätzung war es möglich, diese als kurze

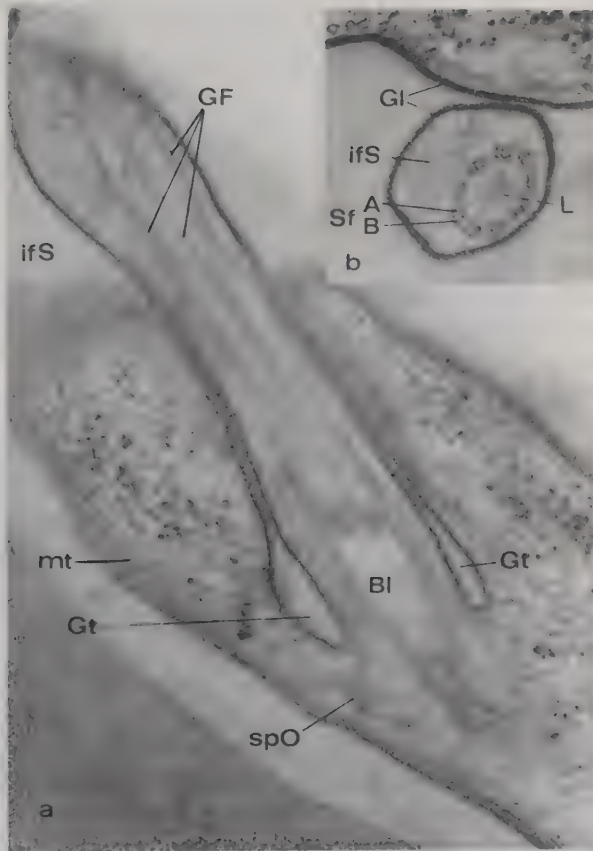


Abb. 4: Geißelapparat von *T. evansi*, Stamm BOGOR

a) Längsschnitt, x 100 000

b) Querschnitt, 9:2 Symmetrie. x 100 000

Bl = Blepharoblast; GF = Geißelfibrillen; Gl = Glycocalix; Gt = Geißeltasche; ifS = Intraflagellarstruktur; L = Ligamentum zwischen den Zentraltubuli; mt = subpellikuläre Mikrotubuli; Sf (A+B) = Subfibrillen A + B; spO = subpellikuläres Organell.

Zylinder darzustellen (Abb. 5a), im Ultradünnschnitt dagegen treten sie als einfache Sprossen hervor (Abb. 5b). An ihre Stelle tritt mit zunehmender Entfernung der Geißel von dem Zelleib eine Sonderbildung der Glycocalix, die undulierende Membran.

Das von einer durchschnittlich 12 nm starken, teilweise leicht gefältelten, relativ dünnwandigen und glatten Doppelmembran umgrenzte Mitochondrium (Abb. 1a u. b) windet sich entlang der Längsachse der Zelle als ein einfaches, schlauchförmiges System. Gelegentlich treten seitlich unbedeutendere Ausbuchtungen auf, wodurch sich Breiten zwischen 0,15 und 0,3 μm ergeben. Der Membranspalt ändert sich entsprechend der Fältelung. Seine kontrastarme, schaumig strukturierte Matrix enthält zahlreiche aus der inneren Membran gebildete tubulöse Elemente, die im Querschnitt rundlich in uneinheitlicher Größe erscheinen. Daneben können vereinzelt an beliebigen Stellen "intramitochondriale Körperchen" (Abb. 1b) beobachtet werden, die sich als osmiophile, feingranulierte, ca. 0,1 μm große, rundlich bis ovale Gebilde manifestieren.

Trotz Anwendung chemischer und physikalischer Präparationsmethoden waren kein Kinetoplast oder kinetoplastähnliche Strukturen darzustellen.

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist in den beiden Formen des granulären und des agranulären Typs vertreten (Abb. 1a). Das rauhe ER durchzieht als weitverzweigtes Tubulussystem, welches Tubulusausläufer der äußeren Kernmembran aufnimmt, die gesamte Zelle. Die ungleichmäßig, aber dicht mit Ribosomen besetzten, unterschiedlich dicken Stränge lagern sich, sofern sie einzeln auftreten, bevorzugt parallel dem System der subpellikulären Mikrotubuli an. Daneben bilden sie auch untereinander lamelläre, lineare oder bogenförmige Komplexe aus. Die ribosomenfreien Lumina des rauhen ER können in ihrer Breite beträchtlich (zwischen 18 und 30 nm) schwanken; kleine zisternenartige Erweiterungen sind hierbei zu erkennen.

Das agranuläre ER erscheint in Form einzelner, bis 0,8 μm langer und ca. 25 nm breiter, geradliniger Tubuli oder kann ebenfalls parallel gerichtete, lamelläre Komplexe ausbilden. Im Gegensatz zum rauhen ER sind die Lumina gleichmäßig breit. Nur an den Endabschnitten können gelegentlich divertikelartige Ausbuchtungen wahrgenommen werden.

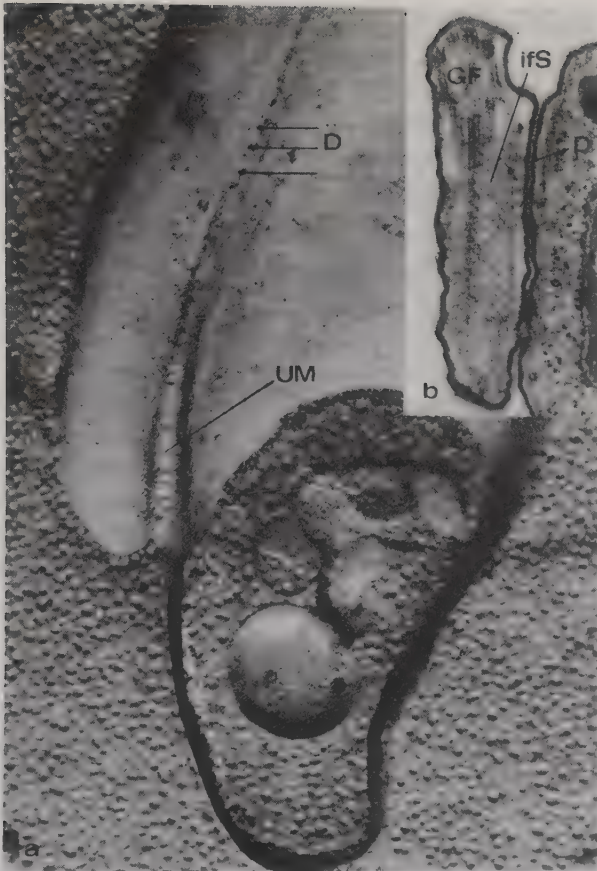


Abb. 5: Kontaktzone zwischen Geißel und Zelleib.

a) nach Gefrierätzung, x 60 000

b) Ultradünnschnitt, x 60 000

D = Desmosomen; GF = Geißelfibrillen; ifS = Intraflagellarstruktur;
UM = undulierende Membran.

Als ein weiterer tubulöser Komplex von ca. $0,5 \mu\text{m}$ Ausdehnung ist auf Ultradünnschnitten der Golgi-Apparat als ein in sich geschlossenes, palisadenförmiges System vornehmlich in der hinteren Zellregion zwischen Zellkern und Blepharoblasten anzutreffen. Mehrere gleich dicke, zusammengelagerte, feine und glattwandige Einzeltubuli mit leicht gewelltem Verlauf besitzen häufig an ihren Enden sackförmige, fast bläschenartige Erweiterungen.

Unter den intrazytoplasmatischen membranbegrenzten Organellen fallen zunächst rundliche bis bacilliforme Grana von durchschnittlich $0,4 \mu\text{m}$ Größe auf. Ihre einfache, glatte oder leicht gewellte Membran umschließt eine heterogene, granulierte Masse, wobei innerhalb einer Ultradünnschnittaufnahme verschieden kontrastierte Grana zumeist gruppiert auftauchen. Hinsichtlich ihres Aussehens zeichnet sich folgendes Bild ab: kleinere und runde Grana haben osmophil und feingranulierten Inhalt. Je größer und gekräußelter ihre Membran ist, desto osmiophober und grobgranulierter erscheint ihre Innenstruktur. Manche von ihnen sind von Auflösungserscheinungen betroffen. Eine besondere Affinität dieser Grana zum rauen ER scheint zu bestehen.

Als eine weitere Gruppe von intrazytoplasmatischen Körpern fallen $0,15 \mu\text{m}$ große, homogene und stark elektronendichte Grana auf. Ihre Lage ist nicht konstant, ihre Anzahl gering (Abb. 1a). - Eine nächste Gruppe von runden Vakuolen von $0,2 \mu\text{m}$ Größe tritt gehäuft im Bereich des Golgi-Apparates und der Geißeltaschenmembran auf. Sie werden von einer einfachen Membran umschlossen und enthalten eine homogene, mäßig elektronendichte Substanz. Sie können über eine stielförmige Verbindung mit dem Lumen der Geißeltasche verbunden sein (Abb. 3b).

Weiterhin lassen sich selten vorkommende, unregelmäßig geformte und ringförmige Gebilde von $0,4 \mu\text{m}$ erkennen. Der osmophile, tubulös erscheinende Randteil enthält eine kontrastarme, heterogene und feingranulierte Masse. Die Ringform kann sich zu einer Bogenform öffnen; meist sind diese Strukturen in benachbarter Lage aufzufinden. Der Konkavseite dieser bogenförmigen Strukturen kann ein kleines elektronendichtes Bläschen angelagert sein.

Im gesamten Zytoplasma werden teils diffus, teils strangförmig angeordnet Ribosomen angetroffen.

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die eigenen elektronenoptischen Befunde an *T. evansi*, Stamm B O G O R, bestätigen im wesentlichen die für die verschiedenen trypomastigoten Formen von Trypanosomen gemachten Angaben der Literatur. Auf einen gemeinsamen Grundbauplan wiesen RUDZINSKA und VICKERMAN (1968), JADIN (1971) und HOARE (1972) hin. Die auf dem Ultradünnschnittverfahren beruhenden Einzelbeschreibungen über *T. lewisi* von ANDERSON und ELLIS (1965), über *T. congolense* von VICKERMAN (1969 a), über *T. evansi* und *T. gambiense* von FROMENTIN u. Mitarb. (1974), über *T. duttoni* von WATSON und LEE (1975) und *T. vivax* von MÜHLPFORDT (1975) erscheinen zur Besprechung der eigenen Ergebnisse ausreichend geeignet.

Auch mit Hilfe der Gefrierätzmethode konnte ich Ergebnisse erzielen, die mit den Arbeiten über *Crithidia fasciculata* von EASTERBROOK (1971), über *T. congolense* von SEED u. Mitarb. (1972), über *T. cruzi* von SEED u. Mitarb. (1973) sowie über *T. brucei* von SMITH u. Mitarb. (1974) zu vergleichen sind.

Zunächst sei auf die grundsätzlichen Unterschiede beider Präparationsverfahren hinsichtlich ihrer Interpretationsmöglichkeit der Zellstrukturen eingegangen. Die beim Ultradünnschnittverfahren erhaltenen Befunde lassen deutlich die membranösen Begrenzungen und die tubulösen Strukturen sichtbar werden. Weiterhin sind auf der betreffenden Schnittebene die Anzahl und das Verteilungsmuster der verschiedenen, frei im Zytoplasma liegenden und bis 0,4 µm großen Organellen zu ermitteln. Nach Ansicht von RUDZINSKA und VICKERMAN (1968) ist dennoch die Bestimmung verschiedener Grana mit Mängeln behaftet, da sie zum Teil gegensätzliche Funktionen erfüllen. Auffällig sind außerdem die osmiophilen filamentösen Unterstrukturen, die besonders im Bereich des Geißelapparates vorkommen. Nach GEYER (1973) ist die starke Kontrastierung der Ultradünnschnitte zum Teil auf die Wirkung des Osmiumtetroxids, das für die Fixierung verwendet wurde, zurückzuführen.

Die Vorzüge der Gefrierätzmethode liegen übereinstimmend nach EASTERBROOK (1971) sowie SEED u. Mitarb. (1973) darin, daß die strukturellen Details ohne aufwendige und mit Artefaktmöglichkeit-

ten behaftete chemische Vorbehandlung dargestellt werden können. Als dreidimensionales Abbildungsverfahren ermöglicht diese Methode die topographische Beurteilung einzelner Zellbestandteile. Hierbei können nach Meinung dieser Autoren die inneren und äußeren Membranoflächen des Zellkörpers, einschließlich der Partikel und Einstülpungen, die undulierende Membran sowie nach SMITH u. Mitarb. (1974) die desmosomalen Verbindungskomplexe und die Struktur der Kernporen aufgezeigt werden. Je nach Bruch- und Spaltwiderstand der einzelnen Strukturen sind entweder Oberflächendarstellungen oder Durchbrüche möglich. Soweit membranbegrenzte Körperchen betroffen sind, werden die Membranschichten auseinandergespalten. Diese Tatsache sehe ich übereinstimmend mit diesen Untersuchern als Grund dafür an, daß mit Ausnahme des Mitochondriums eine weitergehende Bestimmung der zahlreich vorhandenen Grana nicht vorgenommen werden kann. Aus diesem Grunde teilt EASTERBROOK (1971) am Beispiel von *Crithidia fasciculata* die Zellorganellen in drei verschiedene Größenklassen zwischen 35 und 900 nm ein. Als Mitochondrium nimmt er Gebilde ab einer Größe von 500 nm und einer umgebenden Doppelmembran an.

Zur Vorbereitung der Gefrierätzmethode wurde das trypanosomenhaltige Blut noch vor dem Gefrierschutz mit 1%igem Glutaraldehyd vorfixiert. Dadurch bleibt nach MCINTYRE u. Mitarb. (1974) die Penetrationsfähigkeit der Zelle für Glyzerin erhalten. Bei einer alleinigen Verwendung von Glyzerin würden Membranschädigungen und Mikropräzipitationen von Proteinpartikeln im Zytoplasma und auf den Membranen eintreten.

Der Fibrillarkörper der Geißel des Stammes B O G O R von T. evansi zeigt eine geringere Verteilung der protofilamentären Unterstrukturen auf. Dagegen hatten ANDERSON und ELLIS (1965) bei T. lewisi nachgewiesen, daß von der der Intraflagellarstruktur benachbarten, englumigen und von GIBBONS und GRIMSTONE (1960) als Subfibrille B benannten Teile der peripheren Doppeltubuli keine Seitenarme zu dieser gerichtet sind. Ebenso konnte ich die von VICKERMAN (1969 a) bei T. congolense beschriebene "Brezelform" der peripheren Fibrillen, die durch ein äußeres den beiden Subfibrillen A und B bogenförmig anliegendes Ligament gebildet wird, nicht bestätigen. Dagegen fand ich die von VICKERMAN (1969 b) beschriebenen, vom zentralen Tubuluspaar ausgehenden und kranzförmig angeordneten Protofilamente.

Die von ANDERSON und ELLIS (1965) gefundenen 250 Å-Untereinheiten der zentralen Doppeltubuli fehlen bei *Trypanosoma evansi*, Stamm B O G O R.

Das Mitochondrium zeigte die für die Brucei-Gruppe typische Form eines einfachen schlauchförmigen Kanals. Innenstrukturen, die auf den Mitochondriumtyp hinweisen, konnte ich nicht mit Sicherheit darstellen. Nach Ansicht von VICKERMAN (1963) und MÜHLPPFORDT (1964) zeigen besonders *T. evansi* und *T. gambiense* als mechanisch übertragbare Trypanosomen die Fähigkeit, dieses Organell zurückzubilden. Im Gegensatz dazu hat *T. congolense* (VICKERMAN, 1969 a) zahlreiche mitochondriale Verzweigungen. Die nur einfache Ausbildung dieses Organells bei *T. evansi* wird von VICKERMAN (1963) teilweise als Folge der verlorengegangenen zyklischen Entwicklung angesehen. Bei *T. evansi*, Stamm B O G O R, handelt es sich um einen außerordentlich stoffwechselaktiven und mit hoher Reproduktionsrate ausgestatteten Trypanosomenstamm. Dies wird durch den elektronenoptischen Befund eines immer vorhandenen, den ganzen Zelleib durchziehenden Mitochondriums untermauert. Möglicherweise ist dies Ausdruck dafür, daß für diesen Stamm ein natürlicher Vektor im Laufe seiner Entwicklung nur noch als Überträger, nicht dagegen für eine Weiterentwicklung erforderlich ist, wie beispielsweise *T. equiperdum*.

Die von TONER und CARR (1971) als "intramitochondrial granules" bezeichneten Gebilde fand ich an beliebigen Stellen im Mitochondrium des Stammes B O G O R; sie sind daher nicht als Kinetoplaststrukturen anzusehen. Deshalb schließe ich mich der von FROMENTIN u. Mitarb. (1974) verwendeten Bezeichnung "akinetoplastisch" im Hinblick auf die strukturellen Gegebenheiten an. Die von JADIN (1971) verwendete Bezeichnung "dyskinetoplastisch" trifft für den Stamm B O G O R auch wegen des offenbar irreversiblen Fehlens des Kinetoplasten nicht zu.

Bei meinen Untersuchungen an Ultradünnschnitten konnte ich im Gegensatz zu SEED u. Mitarb. (1973) sowie von SMITH u. Mitarb. (1974) am Geißeltaschenhalsbereich keine als Macula adhaerens bezeichnete desmosomale Verkittungszone feststellen. Auch nach Gefrierbruch konnten in diesem Gebiet keine Verbindungsstrukturen aufgefunden werden. Dagegen beobachtete ich im Bereich des Verbindungskomplexes

zwischen Geißel und Zelleib in annähernd regelmäßigen Abständen typische Hafelemente; damit sind die Befunde von SMITH u. Mitarb. (1974) bestätigt. Ergänzend hierzu konnte ich mit Hilfe der Gefrierätztechnik diese Desmosomen als Röhrensystem darstellen, das möglicherweise dem Stoffaustausch zwischen Geißel und Zelleib dient. Die vielfach am Zelleib haftende Geißel von *T. evansi*, Stamm B O G O R, würde also auch neben der Fortbewegung der Oberflächenvergrößerung des Trypanosoms und somit der besseren Nahrungsaufnahme durch Pinozytose dienen. Eine endgültige Klärung dieses Vorgangs steht jedoch noch aus.

Das von ANDERSON und ELLIS (1965), VICKERMAN (1969 a) und MÜHLPFORDT (1975) beobachtete subpelliculäre Organell, ein System aus vier parallel in der Nachbarschaft der Geißeltasche verlaufender Mikrotubuli, konnte ich für den Stamm Bogor ebenfalls nachweisen. Bei diesem Organell könnte es sich um einen Restbestandteil des bei anderen Trypanosomen, so z.B. bei *T. raiae* (PRESTON, 1969) beschriebenen Cytostom mit dicht dabei liegendem subpelliculärem Organell aus fünf Mikrotubuli handeln. Eine echte dem Cytostom zu vergleichende Struktur existiert jedoch bei *T. evansi*, Stamm B O G O R nicht.

Als weitere intrazytoplasmatisch liegende, membranbegrenzte Organellen stellte ich runde bis bacilliforme Grana fest. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die von RUDZINSKA und VICKERMAN (1968) als "membrane bound dense bodies" sowie von BÖHRINGER und HECKER (1975) als "microbody-like inclusions" bezeichneten Gebilde. Die als gestielte Vesikel neben der Geißeltasche liegenden Gebilde stehen mit dem Stoffwechsel im Zusammenhang. Nach den Angaben von VICKERMAN (1969 a) gruppieren sich diese Vesikel auch bei *T. congolense* als "smooth walled vesicles" um die Geißeltasche. Diese bei *T. brucei*, Stamm EATRO 1587, von SMITH u. Mitarb. (1974) auch als "coated vesicles" erwähnten Organellen entstehen durch Knospung und anschließende Abschnürung von der Geißeltaschenmembran aus. Über die Funktion lassen sich noch keine Aussagen machen. Möglicherweise stellen sie einen Weg der Ausschleusung von Zellresten in der Geißeltasche dar, wie ich sie im Ultradünnschnitt wie auch in Gefrierätztaufnahmen aufzeigen konnte. Nach MÜHLPFORDT (pers. Mittei-

lung) findet die Nahrungsaufnahme im Bereich der Geißeltasche statt. Diese Gegebenheit läßt eventuell den Schluß zu, daß Reservestoffe aus der Geißeltasche via gestielte Vesikel in das Zytoplasma gelangen.

In der vorliegenden Arbeit wird anhand von Ultradünnschnitten und Replikas von gefriergeätztem Material die Morphologie von *T. evansi*, Stamm B O G O R, beschrieben. Herausragende Ergebnisse sind das Fehlen eines Kinetoplasten, das ausgeprägte Mitochondrium sowie die mit Hilfe der Gefrierätzung aufgezeigten Oberflächenstrukturen der zahlreichen membranbegrenzten Organellen im Zytoplasma und der Pellikula an Zelleib und Geißel.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Feinstruktur der Blutformen von *Trypanosoma evansi*, Stamm B O G O R, wurde an ultradünngeschnittenem Material und nach Gefrierätzung elektronenmikroskopisch untersucht.

Die Pellikula, aus einer Elementarmembran und einer dieser unterlagerten Membran bestehend und die subpelliculären Mikrotubuli bieten in Aufbau und Anordnung das für alle *Trypanosomen* typische Bild. Die Membranpartikel und -einstülpungen, die undulierende Membran und die Anheftung der Geißel wurden dargestellt. Die intrazellulären Strukturen des untersuchten *Trypanosoma evansi*-Stammes wie Zellkern mit Nukleolus, endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat entsprechen denjenigen anderer *Trypanosomen*. Das einfache, schlauchförmige Mitochondrium enthält vereinzelt intramitochondriale Körperchen.

Ein Kinetoplast oder ähnliche Strukturen fehlen. *T. evansi*, Stamm B O G O R ist deshalb als akinetoplastischer Stamm zu bezeichnen.

Der Geißelapparat, bestehend aus Blepharoblast, Geißel und Geißeltasche zeigt die für den Grundbauplan von trypomastigoten *Trypanosomen* bekannten Merkmale. Die zahlreichen Vakuolen und Vesikel sind von unterschiedlicher Morphologie. Die Funktion der einzelnen Strukturen wird diskutiert.

SUMMARY

Ultrastructural examinations of the morphology of *Trypanosoma evansi*, BOGOR strain, in the blood of mice

The fine structure of the blood-stream forms of *Trypanosoma evansi*, BOGOR strain, was examined on ultrathin-sectioned and freeze-etched material by electron microscopy.

The pellicle consists of an unit membrane, a supporting membrane and of subpellicular microtubules. These structures and their arrangement are found in all trypanosomes. The particles and micropores of the membrane, the undulating membrane and the fixation of

the flagellum were shown. The intracellular structures of the examined strain of *Trypanosoma evansi* such as nucleus, endoplasmic reticulum and Golgi-apparatus correspond to those of other trypanosomes. The simple, canal-like mitochondrion contains solitary intramitochondrial granules.

The kinetoplast as well as kinetoplast-like structures are missing; therefore the BOGOR strain has to be characterized as an akinetoplastic strain.

The flagellar apparatus consisting of the basal body, flagellum and flagellar pocket shows the basic structures of the trypomastigote trypanosomes. The numerous vacuoles and vesicles are of different morphology.

The function of the particular details is discussed.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson, W.A., R.A. Ellis (1965): Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi*: flagellum, microtubules and the kinetoplast.
J. Protozol 12, 483-499
- Anderson, E., L.H. Saxe, H.W. Beams (1956): Electron microscope observations of *Trypanosoma equiperdum*.
J. Parasitol. 42, 11-16
- Angelopoulos, E. (1970): Pellicular microtubules in the family Trypanosomidae.
J. Protozol. 17, 39-51
- Baker, J.R. (1961): The distribution of nucleic acids in *Trypanosoma evansi*.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 55, 518-524
- Böhringer, S., Hecker (1975): Quantitative ultrastructural investigations of the life cycle of *Trypanosoma brucei*: a morphometric analysis.
J. Protozol. 22, 463-467
- Cosgrove, W.B. (1973): Why kinetoplasts?
J. Protozol. 20, 191-194
- Dalton, A.J. (1965): A chrome-osmium fixative for microscopy.
Anat. Rec. 121, 281.
- Easterbrook, K.B. (1971): The ultrastructure of *Crithidia fasciculata*. A freeze-etching study.
Can. J. Microbiol. 17, 277-279
- Fromentin, H., S. Thaithong, M.M. Adrian (1974): Ultrastructure comparée de souches dyskinetoplastiques de *Trypanosoma gambiense* et de *Trypanosoma evansi*.
C. R. Acad. Sc. Paris, t. 278, Serie D., 1859-1861
- Fuge, H. (1969): Electron microscopic studies in the intraflagellar structure of trypanosomes.
J. Protozol. 16, 460-466
- Geyer, G. (1973): Ultrahistochemie
G. Fischer Verlag, Stuttgart
- Gibbons, I.R., A.V. Grimstone (1960): On flagellar structure of certain flagellates.
J. Biophys. Biochem. 7, 697-716

- Hoare, C.A., S.C.J. Bennett (1937): Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. III. Spontaneous occurrence of *Trypanosoma evansi* of the kinetonucleus.
Parasitology 29, 28-33
- Hoare, S.A. (1954): The loss of the kinetoplast in trypanosomes with special reference to *Trypanosoma evansi*.
J. Protozol. 1, 43-56
- Hoare, C.A. (1972): The trypanosomes of mammals.
Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh
- Jadin, J.M. (1971): Cytologie et cytophysiologie des trypanosomidae.
Acta Zoologica et Pathologica 53, 1-168
- Killick-Kendrick, R. (1964): The apparent loss of the kinetoplast of *Trypanosoma evansi* after treatment of an experimentally infected horse with berenil.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 51, 481-490
- Macadam, R.F., W.J. Herbert (1970): Fine structural demonstration of cytoplasmatic protrusions (filopodia) in trypanosomes.
Exp. Parasitol. 27, 1-8
- McIntyre, J., Gilula, N., Karnovsky, M. (1974): Cryoprotectant-induced redistribution of intramembranous particles in mouse lymphocytes.
J. Cell Biol. 60, 192-203
- Mühlpfordt, H., M. Bayer (1961): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Protozoen (*T. gambiense*).
Z. Tropenmed. Parasit. 12, 334-346
- Mühlpfordt, H. (1963 a): Über die Bedeutung und Feinstruktur des Blepharoblasten bei parasitischen Flagellaten.
I. Teil.
Z. Tropenmed. und Parasit. 14, 357-398
- Mühlpfordt, H. (1963 b): Über die Bedeutung und Feinstruktur des Blepharoblasten bei parasitischen Flagellaten.
II. Teil.
Z. Tropenmed. u. Parasit. 14, 475-501
- Mühlpfordt, H. (1964): Über den Kinetoplasten der Flagellaten.
Z. Tropenmed. u. Parasit. 15, 1-8
- Mühlpfordt, H. (1975): Elektronenmikroskopische Untersuchungen eines im Rind gehaltenen *Trypanosoma vivax*-Stammes.
Z. Tropenmed. u. Parasit. 26, 1-8

- Ormerod, W.E. (1961): The study of volutin granules in trypanosomes.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 55, 312-327
- Preston, T.M. (1969): The form and function of the cytostome-cytopharynx of the culture forms of the elasmobranch haemoflagellate *Trypanosoma raiae* Laveran & Mesnil.
J. Protozol. 16, 320-333
- Reynolds, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain of electron microscopy.
J. Cell. Biol. 17, 208-212
- Rudzinska, M.A., K. Vickerman (1968): The fine structure.
In: "Infectious blood diseases of man and animals".
Ed., Weinman & M. Ristic.
Acad. Press. New York, 217-306
- Schulz, H., E. Mac Clure (1961): Elektronenmikroskopische Untersuchung des *Trypanosoma cruzi* mit besonderer Berücksichtigung des Periblasten und des Blepharoblasten.
Z. Zellforsch. 55, 389-412
- Seed, T.M., J.M. Gnau, J.P. Kreier, R.M. Pfister (1972):
Trypanosoma congolense: Fine structure study by the carbon replica and freeze-etch technique.
Exp. Parasit. 31, 399-406
- Seed, T.M., S.N. Kreier, R.N. Al-Abbassy, R.M. Pfister (1973):
Trypanosoma cruzi: The ultrastructure of culture forms as examined by the carbon replication, freeze-etching and scanning electron microscopy.
Z. Tropenmed. Parasit. 24, 146-160
- Smith, D.S., A.R. Njogu, M. Cayer, U. Järlfors (1974): Observations on freeze-fractured membranes of trypanosome.
Tissue & Cell 6, 223-241
- Taylor, A.E.R., D.G. Godfrey (1969): A new organelle of bloodstream salivarian trypanosomes.
J. Protozol. 16, 466-470
- Toner, P.G., K.E. Carr (1971): Cell structure.
Churchill Livingstone, Edinburgh & London
- Vickerman, K. (1968): The surface coat of bloodstream trypanosomes.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 463.
- Vickerman, K. (1969 a): The fine structure of *Trypanosoma congolense* in its bloodstream phase.
J. Protozol. 16, 54-69

- Vickerman, K. (1969 b): On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes.
J. Cell. Sci. 5, 163-193
- Vickerman, K., B.P. Eyden (1973): Some problems in interpreting electron micrographs of trypanosomes.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 67, 275.
- Watson, L.P., C.M. Lee (1975): Ultrastructure of *Trypanosoma duttoni*.
Z. Parasitenk. 46, 133-140
- Wight, K.A., W.H.R. Lumsden (1969): The fine structure of *Trypanosoma brucei*.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 63, 13-14

LEBENS LAUF

Am 1. Juli 1947 wurde ich, Berthold v. Blumenthal, als Sohn des Arztes Dr. R. v. Blumenthal und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Riemer in Seligenstadt am Main, Ldkrs. Offenbach geboren.

Von 1954 bis 1955 besuchte ich die Volksschule Ginsheim, von 1955 bis 1958 die Volksschule Gundelsheim und anschließend das Albert Schweitzer Gymnasium in Neckarsulm, an dem ich im Juni 1967 die Reifeprüfung im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig ablegte.

Nach Ableistung des Grundwehrdienstes studierte ich vom Sommersemester 1969 an Tiermedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München, wo ich die Tierärztliche Prüfung im Sommersemester 1974 bestand. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich im Oktober 1974.

Herrn Professor Dr. Dr. J. Boch danke ich für die
Übergabe des Themas sowie für die Bearbeitungsmöglich-
keit im Institut sehr herzlich.

Herrn Dr. E. Göbel bin ich zu ganz besonderem Dank ver-
pflichtet. Seine jederzeit gewährte freundliche Hilfs-
bereitschaft trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit
bei.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau H. Meyer für die
bereitwillige Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

